

## 研究題目：マイクロ流体デバイスを用いた酵母の単離解析手法の開発

神戸大学大学院工学研究科 機械工学専攻

肥田 博隆

### 1. 研究開始当初の背景

酵母は、醸造による食品製造やエタノールの生産、モデル生物としての利用など、基礎研究や工業分野において重要な役割を担っている。従来、酵母および発酵に関する研究は、フラスコ等で酵母を培養し、解析を行うことが一般的であるが、直径  $10\mu\text{m}$  未満の微小な酵母を操作、観察し、かつ周囲温度や試薬などの条件の最適化を行うためには多大な労力が掛かる点や、解析から得られる知見は、その原理的に多数の酵母の性質を平均化したものであり、酵母の個体差を解明することは原理的に困難である点などの課題が存在している。近年、細胞の詳細な解析を実現する手法として、マイクロ流体デバイスの応用が注目されている。マイクロ流体デバイスは、微細加工技術により作製した幅や高さが数 $\mu\text{m}$ ～数  $100\mu\text{m}$  程度の流路構造で構成され、スケール効果により層流が形成されるため、微細かつ柔軟な細胞を高い空間分解能で操作が可能となる。この特性を利用し、マイクロ流体デバイスにより酵母の操作、分析に関する研究が報告されているが、微小空間内での酵母の分裂に関する研究は限定的であり、またマイクロ流体デバイスに導入した酵母を抽出する方法など、技術的課題が存在している。

### 2. 本研究の目的

本研究は、マイクロ流体デバイスを応用し、酵母を単離し、培養およびエタノールの生産性など、個体ごとの性質を解析するための新規技術の確立を目的とする。具体的には、マイクロメートルオーダーの微小流路で構成されるマイクロ流体デバイスを作製し、捕捉機構による酵母の単離、空圧式バルブのデバイスへの集積化による微小チャンバーへの分離、ならびに顕微鏡観察による培養観察を試みる。本研究で得られる知見はエタノール生成技術の向上に寄与し、将来的にはエネルギー問題などの解決へと貢献が期待される。

### 3. 方法

#### (1)マイクロ流体デバイスの設計・作製

図 1 に、本研究で作製したマイクロ流体デバイスの概略図を示す。本デバイスは、酵母の操作をするためマイクロ流路を持つトラップ層と、空圧式バルブにより酵母を微小チャンバー内に分離するためのバルブ層の 2 層構造となっている。トラップ層とバルブ層の材料には、シリコーンエラストマー PDMS (Poly-dimethylsiloxane)を採用した。トラップ層(図 2)は、幅  $100\mu\text{m}$ 、高さ  $10\mu\text{m}$  のマイクロ流路が 3 列配置されており、それぞれの流路は縦横  $300\mu\text{m}$  の微小チャンバーを有している。チャンバーの中央には、酵母を単離するため、酵母の平均直径である  $5\mu\text{m}$  よりも小さい幅  $3\mu\text{m}$  のスリットを設置した。酵母の分析実験では、酵母をマイクロ流路に導入したのち、空気圧によりバルブを作動することで、微小チャンバー内に捕捉した酵母を分離し、培養が可能となる(図 3)。

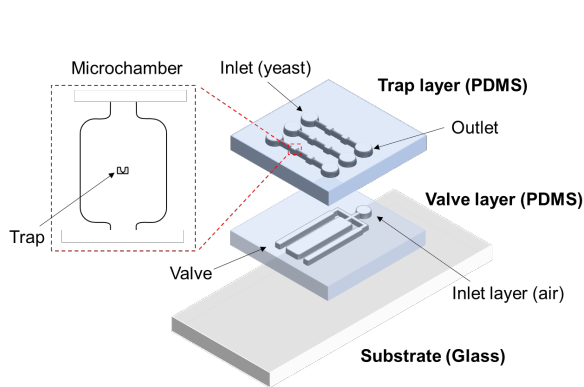


図1 マイクロ流体デバイスの概略図

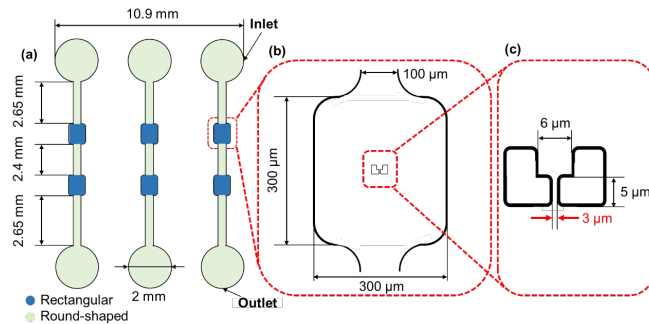


図2 トラップ層 (酵母の捕捉・培養)

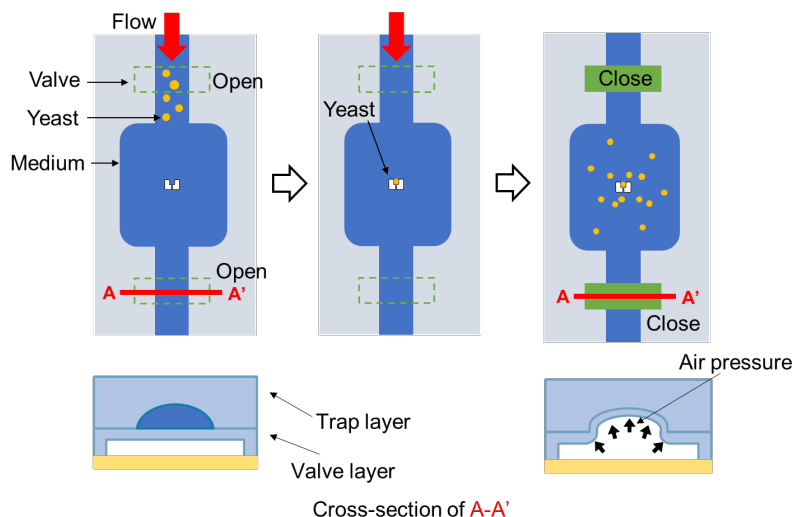


図3 マイクロ流体デバイス上での酵母の導入と培養

本デバイスは、マスクレス露光装置(PALET, ネオアーク社)を用いたフォトリソグラフィによる微細な鋳型の作製, およびその鋳型を用いたソフトリソグラフィと呼ばれる PDMS への転写の 2 段階工程により作製した。鋳型の作製では、ネガ型レジスト(SU-8, 日本化薬社), およびポジ型レジスト(AZ P4620, メルクエレクトロニクス社)の 2 種類のフォトレジストを用いた。AZ P4620 のガラス転移点は約 120 °C であり、フォトリソグラフィによるパターニング後に加熱することでレジストが流動し、断面形状に矩形からドーム形に変形することができる。以下に、作製プロセスの概要を示す。

#### (1) 鋳型の作製

(i) SU-8 パターニング：シリコン基板上にスピコートにより SU-8 を塗布し (トラップ層：厚さ 10 μm, バルブ層：厚さ 50 μm), フォトリソグラフィによりマイクロ流路の一部をパターニングした。

(ii) AZ P4620 パターニング：トラップ層について、SU-8 をパターニングしたシリコン基板上にスピコートにより AZ P4620 (厚さ 10 μm) を塗布し、フォトリソグラフィによりバルブ部の鋳型を形成した。

(iii) リフロー：ホットプレートで基板を加熱することで(120 °C, 10 min), AZ P4620 を流動させ、バルブ部の断面形状を矩形型からドーム形状へと変形させた。

#### (2) ソフトリソグラフィ

(i) PDMS の鋳型への流し込み：主剤および硬化剤の質量混合比を 5 : 1 と 20 : 1 とした PDMS をトラップ層とバルブ層の SU-8 鋳型にそれぞれ塗布し、減圧により内在する気泡を除去した。なお、バルブ層への塗布はスピコータを用い、薄膜を形成した。

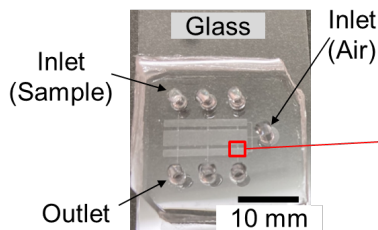


図4 マイクロ流体デバイス

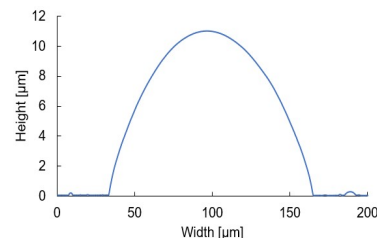
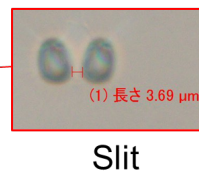
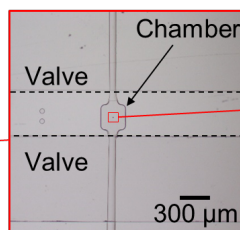


図5 バルブ部の断面形状

(ii) 硬化処理：電気炉で加熱し(80°C, 20 min), PDMS を硬化させた。このとき、硬化剤の割合が大きいトラップ層は十分に硬化する一方で、硬化剤の割合が小さいバルブ層は表面が粘着性を有する状態となる。

(iii) ボンディング：トラップ層の PDMS チップをバルブ層に貼り合わせ、電気炉で加熱し(80°C, 2 h), 硬化することで接着固定した。その後、PDMS チップとガラス基板の接着面に対し、反応性イオンエッチング装置(RIE-10NR, サムコインターナショナル研究所)を用いて酸素プラズマ処理を行い、ホットプレートで加熱し(120 °C for 15 min), PDMS チップをガラス基板に接着した。

図4に作製したマイクロ流体デバイスの写真を示す。AZ P4620 で形成したバルブ部の形状について、触診式段差計の測定より、リフロー後にドーム型に変形したことを確認した(図5)。

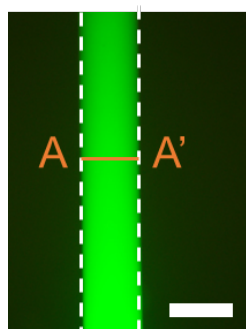
## (2)マイクロ流体デバイス上での酵母の培養

作製したマイクロ流体デバイス上で出芽酵母(*Saccharomyces Cerevisiae*, F118 株)を用い、微小チャンバー内に隔離した酵母の観察を行った。マイクロ流体デバイスを顕微鏡のステージ上で固定し、ペリスタポンプ(AC-2120, アトー 流量 0.1 mL/h)を用いてトラップ層のマイクロ流路に酵母懸濁液を送液し、微小チャンバー内のスリットでの酵母の捕捉を顕微鏡で確認した。その後、不要な酵母を除去するために、マイクロ流路に培養液のみを流量 0.1 mL/h の条件で送液した。コンプレッサーを用いてバルブを駆動し、微小チャンバーの出入口を閉鎖した状態で周囲温度を 23°C に保持し、酵母の増殖の経時変化を解析した。

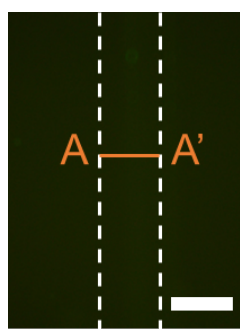
## 4. 結果

### (1)バルブの駆動試験

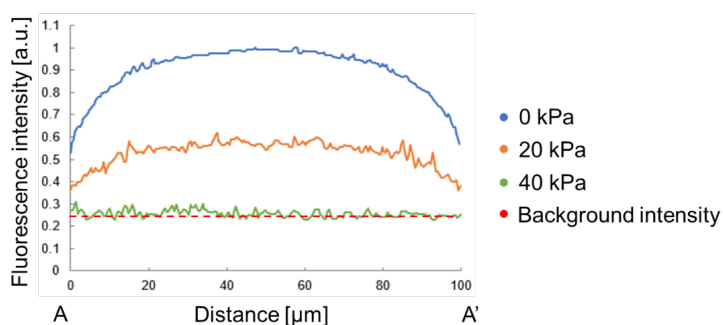
蛍光試薬(フルオレセイン水溶液)をトラップ層流路に送液した後、コンプレッサーを用いて空気圧によりバルブを駆動し、流路の閉塞状態を評価した(図6)。画像解析ソフトによる蛍光輝度の計測より、印加圧力が 40 kPa 以上のときに流路は十分に閉鎖され、微小チャンバー内に酵母を保持、培養が可能であることを確認した。



0 kPa



40 kPa



バルブ部の蛍光輝度計測

図6 バルブの駆動試験

## (2)酵母の培養実験

図7に、酵母の培養実験において本研究で用いたシステムの写真を、図8に微小チャンバー内のスリットにより捕捉した酵母を示す。酵母より微小なスリットにより、単一の酵母を捕捉することに成功した。一方で、一部の酵母は微小チャンバーの壁面に付着し、残留する様子が確認された。今後は液体培地の送液の条件、およびスリット形状を最適化することにより、任意の量の酵母の捕捉が可能になると考えられる。

図9に微小チャンバー内での酵母の培養結果を示す。閉鎖された微小空間内で酵母の増殖を確認した。培養条件の評価として、酵母数の経時変化(図10)をもとに、増殖ポテンシャルを表す比増殖速度を算出した結果、 $0.31 \text{ h}^{-1}$ となり、一般的な培養系での値と同程度であることから、本研究で作製したマイクロ流体デバイスで酵母の培養分析が可能である見通しを得た。

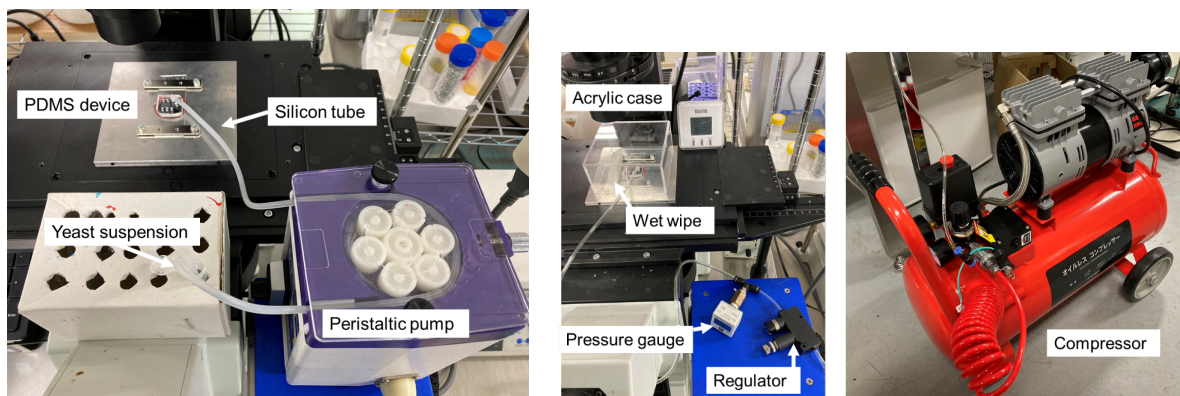
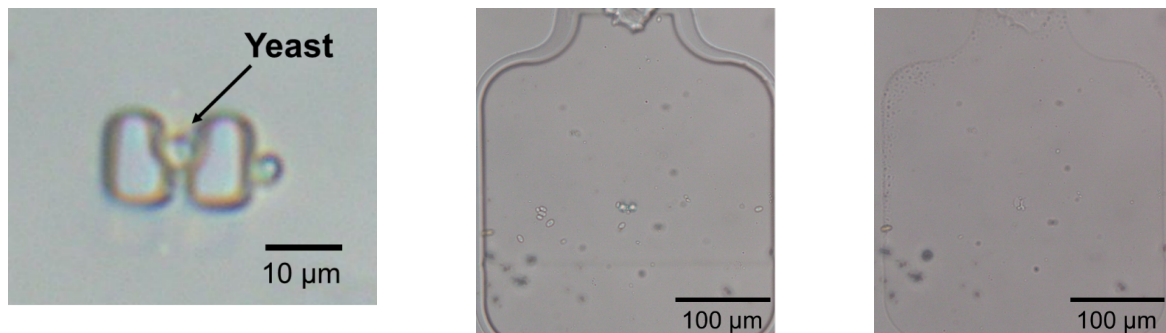


図7 マイクロ流体デバイスを用いた酵母の培養システム



導入直後

10時間後

図8 単離した酵母

図9 微小チャンバー内での酵母の培養

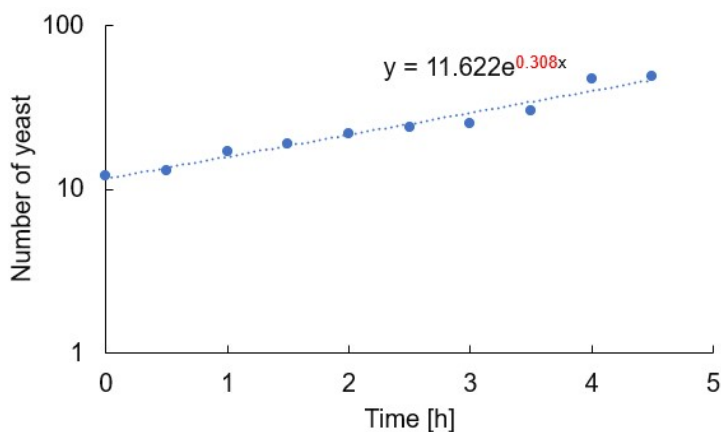


図10 デバイス上での酵母数の経時変化

## 結言

本研究では、酵母の単離解析を目的として、マイクロ流体デバイスを用いた解析手法を開発した。マイクロ流体デバイスに空圧式バルブを集積化することにより、酵母の単離、および微小チャンバー内での培養を可能とし、微小チャンバー内に隔離した酵母培養で得られた比増殖速度は、デバイス外での培養と同程度であることを確認した。今後は、微小チャンバー内での酵母の増殖を促進させるため、デバイスの形状および実験条件の最適化を行うとともに、解析後にデバイスより酵母を回収する機構を付与し、分析後の酵母の実用化を目指す。

## 謝辞

本研究で用いた酵母は、神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 教授 荻野千秋先生より分与されました。本研究は、川西記念新明和教育財団の助成を受けたものです。本財団に心より感謝申し上げます。

## 研究成果

### 国内学会発表

1. 矢郷望, Prihardi Kahar, 荻野千秋, 神野伊策, 肥田博隆, “酵母の個別解析のためのバルブ付きマイクロ流体デバイスの開発”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 46 回研究会, 徳島, 2022 年 11 月 14 日～16 日
2. 藤原稜平, Prihardi Kahar, 荻野千秋, 神野伊策, 肥田博隆, “酵母の個体差の解析を目的とした空圧バルブ付きマイクロ流体デバイスの開発”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 48 回研究会, 熊本, 2023 年 11 月 6 日～8 日